

基于线粒体 COI 基因的青海省 44 种蚤类的分子鉴定及系统发育分析

马英¹, 李海龙¹, 何建¹, 赵延梅¹, 杨汉青¹, 鲁亮^{2,*}, 刘起勇²

(1. 青海省地方病预防控制所, 西宁 811602; 2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102200)

摘要:【目的】本研究应用 DNA 条形码技术对青海省部分蚤种进行鉴定,旨在弥补蚤类传统形态分类方法的不足。【方法】通过 PCR 扩增 3 总科 6 科 22 属 44 种共 182 头蚤类标本的线粒体 COI 基因片段(约 600 bp)并进行测序和比对;用 K2P 模型计算种内及种间遗传距离;以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。【结果】共测得 182 条 COI 基因序列片段(GenBank 登录号: MG138154–MG138335);分析可知蚤种内遗传距离 0.01%~2.90%,种间遗传距离 4%~12%,种间遗传距离显著大于种内遗传距离。系统发育树显示,同一物种的不同个体均形成高支持率的单系,种间分支很明显。【结论】本研究结果表明 COI 基因可以用于蚤类的快速鉴定。

关键词: COI 基因;蚤类;DNA 条形码技术;分子鉴定;系统发育;青海

中图分类号: Q969 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)04-0488-10

Molecular identification and phylogenetic analysis of 44 species of fleas in Qinghai Province, western China based on mtDNA COI gene sequence

MA Ying¹, LI Hai-Long¹, HE Jian¹, ZHAO Yan-Mei¹, YANG Han-Qing¹, LU Liang^{2,*}, LIU Qi-Yong²

(1. Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xining 811602, China; 2. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102200, China)

Abstract:【Aim】DNA barcoding method was used to identify flea samples from Qinghai Province, western China in order to make up the deficiency of the traditional morphological classification method in this study.【Methods】The partial fragments (about 600 bp) of the mtDNA COI gene of 182 flea individuals that belong to 3 superfamilies, 6 families, 22 genera and 44 species were amplified by PCR, sequenced and aligned. The intra- and inter-species genetic distances were calculated with K2P model, and a phylogenetic tree was constructed with the neighbor-joining (NJ) method.【Results】Totally 182 COI gene sequences (GenBank accession no.: MG138154–MG138335) were sequenced successfully. The inter-species genetic distance (4%–12%) was significantly greater than the intra-species genetic distance (0.01%–2.90%). The NJ tree obtained showed that samples of the same species formed monophyletic groups with high support value, and inter-species branches were clear.【Conclusion】The results confirm that COI gene can be used in molecular identification of fleas.

Key words: COI gene; flea; DNA barcoding; molecular identification; phylogeny; Qinghai

近年新发展起来的 DNA 条形码技术具有客观、简便、准确、快速、易操作等优点,它的出现弥补了传

统形态分类的诸多不足。线粒体 COI 基因已广泛应用于昆虫的种类鉴定以及发现隐存种,成为昆虫

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560521, 31060279); 青海省基础研究计划项目(2016-ZJ-770); 青海省鼠疫防控及研究重点实验室项目(2017-ZJ-Y22)

作者简介: 马英,女,1973年6月生,青海互助人,硕士,研究员,研究方向为鼠疫防制, E-mail: mayingxn@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: luliang28@sohu.com

收稿日期 Received: 2017-08-08; 接受日期 Accepted: 2018-01-12

物种鉴定效率、发现新种和隐存种、研究系统进化关系、保护昆虫物种资源多样性等研究领域的重要方法之一(刘慎思等, 2012)。

青海省地理景观多样, 蚤类区系丰富, 现发现 165 种和亚种, 约占全世界蚤类总数的 7%, 占我国蚤总数的 24%, 其中有 3 个属和 53 个种为青藏高原特有种, 故具有较高的科学价值(蔡理芸等, 1987)。蚤类不仅因叮刺和吸血骚扰人畜使其不得安宁或引起过敏性皮炎和贫血造成直接危害, 更重要的是它作为某些重要传染病如鼠疫、地方性斑疹伤寒和土拉菌病的媒介作用不容小觑(Dunnet *et al.*, 1991)。常规形态学手段进行蚤种鉴定必须具备长期经验积累和丰富的分类知识, 过程相对复杂和低效, 这对于年轻专业人员有很大的难度; 同时对蚤类透明标本的制作要求较高, 需要保持蚤种形态特征完整, 残缺标本或片段则无法进行物种分类鉴定。

鉴于上述原因, 本研究选用 DNA 条形码技术对青海寄生蚤种的 COI 基因序列进行测定和分析, 旨在探索建立快速高效的医学媒介鉴定新方法, 积累青海蚤类 COI 基因片段序列数据信息, 建立青海省 DNA 蚤类条形码信息及资源数据库, 有助于促进蚤类生物学、生态学、生理学等相关领域的研究。

1 材料与方法

1.1 蚤类样本及其形态分类鉴定

本研究使用的 182 头蚤样本, 采自青海省 5 州 1 市 12 县, 样点采集信息见表 1。将采集的蚤标本用 75% 乙醇保存, 带回实验室后在光学显微镜下进行镜检, 按《青海高原蚤目志》(蔡理芸等, 1997) 中所列的检索分类特征进行分类鉴定, 共鉴定蚤种 42 种, 隶属于 3 总科 6 科 22 属(表 1)。提取 DNA 前, 将置于 75% 酒精中的蚤用眼科镊轻轻摄出, 置于解剖镜下, 用手术刀片将其腹部轻轻切开 2~3 个小切口。因蚤体的几丁质外骨骼要留做凭证标本, 为保持标本的完整性, 注意一定不能切断蚤体。再将已切的单头蚤体放入 1.5 mL 离心管中提取 DNA(防止样本污染)。提取 DNA 后剩余的几丁质外骨骼做成玻片标本后作为凭证标本用于形态鉴定的复核。

1.2 DNA 提取

利用上述个体样本, 使用 Qiagen DNeasy 血液和组织试剂盒(Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit)按

操作手册提取单头蚤的总 DNA。

本实验共制备 182 份蚤 DNA 样品, 将提取的 DNA 置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.3 COI 基因 PCR 扩增

在 25 μ L 反应体系中: 10 $\times$ buffer 2.5 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L, 10 μ mol/L dNTPs 0.5 μ L, 蚤 DNA 模板 2 μ L, Taq DNA 聚合酶(0.75 U) 0.15 μ L(宝生物大连生物有限公司)。每次反应均设空白对照。扩增时选用 2 组引物(Folmer *et al.*, 1994; Hajibabaei *et al.*, 2006) 扩增 COI 基因片段, 即 L1490(5'-GTCAACAAATCATAAA GATATTG-3') 和 H2198(5'-AAACTTCAGGGTGACC AAAAAAT-3'), 以及 LepF(5'-ATTCAACCAATCATA AAGATATTGG-3') 和 LepR(5'-TAAACTTCTGGATGT CCAAAAAATCA-3'), 以获得清晰目标条带和质量较高的测序峰图。使用 L1490/H2198 引物扩增切唇蚤科(Coptosyllidae)、细蚤科(Leptosyllidae)和角叶蚤科(Ceratophyllidae)(山蚤属 *Oropsylla*、盖蚤属 *Callopsylla*、单蚤属 *Callopsylla*) 的蚤种, LepF/LepR 引物扩增蚤科(Pulicidae)、多毛蚤科(Hystrichopsyllidae)、栉眼蚤科(Ctenophthalmidae)和角叶蚤科(Ceratophyllidae)(副角蚤属 *Paracera*、瘴蚤属 *Amalaraeus*、倍蚤属 *Amphipsylla*) 的蚤种。

L1490/H2198 引物扩增条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 35 个循环; LepF/LepR 扩增条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 10 个循环; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 30 个循环。

1.4 蚤 COI 基因片段测序

PCR 扩增产物以 100 + 1.5 kb DNA Ladder 作为分子量标准对照, 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 选取目标条带清晰的样品送北京擎科生物技术有限公司进行双向测序。扩增效果和测序结果不好的样本构建克隆载体, 经蓝白斑筛选法筛选出阳性克隆, 用 M13 引物扩增鉴定后测序。测序结果首先用 Chromos 软件观察测序峰图质量, 如果峰图质量很低不能准确判断碱基, 则重新进行扩增和测序。所得序列经与 GenBank 中蚤类序列比对后确认是蚤类的 COI 基因, 并排除假基因的可能。将确认后的序列提交至 GenBank, 获得 GenBank 登录号。

1.5 蚤 COI 基因序列处理与系统发育分析

用 Clustal X(Thompson *et al.*, 1997) 软件进行多重序列比对, 并进行适当的手工调整。同时将测

表 1 采自青海省实验用样本的采集信息及 GenBank 序列号

Table 1 Collecting data of samples and GenBank accession numbers of fleas from Qinghai Province, western China used in this study

科 Family	蚤种 Species	宿主 Host	采集地点 Sampling locality	经纬度 Longitude and latitude	蚤数量 Number of fleas	样本编号及其 GenBank 登录号 Nos. of samples and their GenBank accession nos.
蚤科 Pulicidae	人蚤 <i>Pulex irritans</i>	喜马拉雅旱獭 <i>Marmota himalayana</i>	兴海 Xinghai	35°16'N, 99°58'E	2	Z49 (MG138328), Z50 (MG138329)
	铁氏角头蚤 <i>Echidnophaga tiscadaea</i>	子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	格尔木 Golmud	36°20'N, 95°05'E	2	Z19 (MG138326), Z21 (MG138327)
切唇蚤科 Coptosyllidae	叶状切唇蚤 <i>Coptosylla lamellifer</i>	子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	民和 Minghe	36°19'N, 102°52'E	8	A05 (MG138154), Z4_09 (MG138318), 04-04 (MG138319), A07 (MG138320), A08 (MG138321), B12-31 (MG138322), B11-31 (MG138323), 005-04 (MG138330)
			格尔木 Golmud	36°20'N, 95°05'E	1	Z18 (MG138325)
			循化 Xunhua	35°48'N, 102°41'E	3	Z2_09 (MG138316), B81-2 (MG138317), A59-42 (MG138324)
	多刺多毛蚤 <i>Hystriechopsylla multidentata</i>	花鼠 <i>Tamias sibiricus</i>	循化 Xunhua	35°48'N, 102°41'E	3	A59-42 (MG138324)
栉眼蚤科 Ctenophthalmidae	多刺狭蚤 <i>Stenopoeia polyspina</i>	甘肃鼯鼠 <i>Myospalax cansus</i>	兴海 Xinghai	35°16'N, 99°58'E	4	Z12 (MG138220), Z13 (MG138221), Z177 (MG138242), Z178 (MG138243)
	细柄新蚤 <i>Neopsylla angustimanubra</i>	青海田鼠 <i>Microtus fuscus</i>	久治 Jiuzhi	33°31'N, 101°30'E	1	Z207 (MG138244)
	副规新蚤 <i>Neopsylla paranoma</i>	甘肃鼯鼠 <i>Myospalax cansus</i> , 黄胸鼠 <i>Rattus tanezumi</i>	兴海 Xinghai	35°16'N, 99°58'E	3	Z81 (MG138226), Z82 (MG138227), Z84 (MG138228)
			互助 Huzhu	36°50'N, 102°26'E	3	Z9_09 (MG138212), B7-11 (MG138215), B9-11 (MG138216)
蚤科 Pulicidae	阿巴盖新蚤 <i>Neopsylla abagaiui</i>	长尾仓鼠 <i>Cricetulus longicaudatus</i>	尖扎 Jianzha	36°05'N, 101°42'E	1	Z95 (MG138234)
	盔状新蚤 <i>Neopsylla galea</i>	小毛足鼠 <i>Phodopus roborovskii</i> , 子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	都兰 Dulan	36°03'N, 98°11'E	2	Z94 (MG138233), Z96 (MG138235)
			平安 Pingan	36°20'N, 101°54'E	1	Z21_09 (MG138213)
			都兰 Dulan	36°03'N, 98°11'E	5	Z88 (MG138229), Z89 (MG138230), Z90 (MG138231), Z92 (MG138232), Z224 (MG138246)
蚤科 Pulicidae	类新蚤 <i>Neopsylla compar</i>	长尾仓鼠 <i>Cricetulus longicaudatus</i> , 子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	都兰 Dulan	36°03'N, 98°11'E	4	Z74 (MG138222), Z76 (MG138223), Z77 (MG138224), Z78 (MG138225)
	鞍新蚤 <i>Neopsylla sellaris</i>	甘肃鼯鼠 <i>Myospalax cansus</i>	久治 Jiuzhi	33°31'N, 101°30'E	1	Z210 (MG138245)
	五侧纤蚤邻近亚种 <i>Rhadinopsylla dahurica vicina</i>	高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i>	共和 Gonghe	36°30'N, 100°29'E	3	Z7 (MG138218), Z165 (MG138236), Z171 (MG138241)
			同仁 Tongren	35°12'N, 101°47'E	1	Z166 (MG138237)
蚤科 Pulicidae			祁连 Qilian	38°07'N, 100°15'E	1	Z169 (MG138239)

续表 1 Table 1 continued

科 Family	蚤种 Species	宿主 Host	采集地点 Sampling locality	经纬度 Longitude and latitude	蚤数量 Number of fleas	样本编号及其 GenBank 登录号 Nos. of samples and their GenBank accession nos.
细蚤科 Leptopsyllidae	五侧纤蚤指名亚种 <i>Rhadinopsylla dahurica dahurica</i>	高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i> , 洮州绒鼠 <i>Caryomys ena</i>	兴海 Xinghai 久治 Jiuzhi 循化 Xunhua	35°16'N, 99°58'E 33°31'N, 101°30'E 35°48'N, 102°41'E	2 1 1	Z8 (MG138219), Z170 (MG138240) Z167 (MG138238) C66-51 (MG138217)
	朝鲜叉蚤 <i>Doratopsylla coreana</i>	山地背纹齧鼠 <i>Sorex bedfordiae</i>	平安 Pingan	36°20'N, 101°54'E	1	Z39_09 (MG138214)
	缓慢细蚤 <i>Leptopsylla segnis</i>	长尾仓鼠 <i>Cricetulus longicaudatus</i>	同仁 Tongren	35°20'N, 101°56'E	1	A39-15 (MG138247)
	栉头细蚤 <i>Leptopsylla pectiniceps</i>	朝鲜姬鼠 <i>Apodemus peninsulae</i>	互助 Huzhu	36°50'N, 102°26'E	2	Z45_09 (MG138248), Z47_09 (MG138249)
	迟钝中蚤指名亚种 <i>Mesopsylla hebes hebes</i>	三趾跳鼠 <i>Dipus sagitta</i>	格尔木 Golmud	36°20'N, 95°05'E	6	Z173 (MG138159), Z1 (MG138250), Z2 (MG138251), Z159 (MG138252), Z160 (MG138253), Z172 (MG138254)
	介中草足蚤 <i>Geusibia intermedia</i>	甘肃鼠兔 <i>Ochotona cansus</i>	祁连 Qilian	38°07'N, 100°15'E	1	Z25 (MG138331)
	窄板颞蚤 <i>Frontopsylla nakagawai</i>	柴达木根田鼠 <i>Microtus limnophilus</i> , 朝鲜姬鼠 <i>Apodemus peninsulae</i> , 甘肃鼠兔 <i>Ochotona cansus</i> , 社鼠 <i>Niviventer confucianus</i>	兴海 Xinghai 久治 Jiuzhi 尖扎 Jianzha 循化 Xunhua	35°16'N, 99°58'E 33°31'N, 101°30'E 36°05'N, 101°42'E 35°48'N, 102°41'E	1 2 1 1	Z100 (MG138256) Z103 (MG138257), Z108 (MG138258), Z112 (MG138259) Z26_09 (MG138255)
	角尖眼蚤 <i>Ophthalmopsylla praefecta</i>	五趾跳鼠 <i>Allactaga sibirica</i> , 柴达木根 田鼠 <i>Microtus limnophilus</i> , 青海田鼠 <i>Microtus fuscus</i>	都兰 Dulan 兴海 Xinghai 共和 Gonghe	36°03'N, 98°11'E 35°16'N, 99°58'E 36°13'N, 100°31'E	1 5 1	Z115 (MG138260) Z117 (MG138261), Z118 (MG138262), Z119 (MG138263), Z120 (MG138264), Z125 (MG138265) Z214 (MG138266)
	长突眼蚤 <i>Ophthalmopsylla kiritshchenkoi</i>	小毛足鼠 <i>Phodopus roborovskii</i>	共和 Gonghe	36°13'N, 100°31'E	3	Z121 (MG138267), Z123 (MG138268), Z124 (MG138269)
	直狭怪蚤 <i>Paradoxopsyllus stenotus</i>	子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i> , 长尾仓 鼠 <i>Cricetulus longicaudatus</i>	都兰 Dulan 尖扎 Jianzha	36°19'N, 98°06'E 36°05'N, 101°42'E	2 1	Z3 (MG138270), Z162 (MG138272) Z4 (MG138271)
	细钩双蚤 <i>Amphipsylla tenuihama</i>	子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i> , 小毛足 鼠 <i>Phodopus roborovskii</i>	都兰 Dulan 共和 Gonghe	36°03'N, 98°11'E 36°13'N, 100°31'E	1 1	Z151 (MG138333) Z234 (MG138334)
	共和双蚤 <i>Amphipsylla gongheensis</i>	小毛足鼠 <i>Phodopus roborovskii</i>	共和 Gonghe	36°13'N, 100°31'E	10	Z130 (MG138298), Z153 (MG138299), Z229 (MG138300), Z230 (MG138301), Z231 (MG138302), Z244 (MG138303), Z247 (MG138304), Z249 (MG138305), Z253 (MG138306), Z258 (MG138307)

续表 1 Table 1 continued

科 Family	蚤种 Species	宿主 Host	采集地点 Sampling locality	经纬度 Longitude and latitude	蚤数量 Number of fleas	样本编号及其 GenBank 登录号 Nos. of samples and their GenBank accession nos.
长鬃双蚤 <i>Amphipsylla longispina</i>		长尾仓鼠 <i>Cricetulus longicaudatus</i> , 小 毛足鼠 <i>Phodopus roborovskii</i> , 黄胸鼠 <i>Rattus tanezumi</i> , 甘肃鼠兔 <i>Ochotona cansus</i>	平安 Pingan	36°20'N, 101°54'E	2	Z13_09 (MG138281), Z19_09 (MG138282),
			共和 Gonghe	36°13'N, 100°31'E	5	Z131 (MG138290), Z154 (MG138295), Z158 (MG138335), Z235 (MG138296), Z246 (MG138297)
			互助 Huzhu	36°50'N, 102°26'E	2	B103-49 (MG138285), Z49_09 (MG138283),
			化隆 Hualong	36°15'N, 101°58'E	1	Z50_09 (MG138284)
			格尔木 Golmud	36°24'N, 95°03'E	3	Z126 (MG138286), Z127 (MG138287), Z128 (MG138288)
			兴海 Xinghai	35°16'N, 99°58'E	3	Z129 (MG138289), Z145 (MG138292), Z146 (MG138293)
			祁连 Qilian	38°07'N, 100°15'E	1	Z143 (MG138291)
			都兰 Dulan	36°03'N, 98°11'E	1	Z152 (MG138294)
			久治 Jiuzhi	33°31'N, 101°30'E	5	Z139 (MG138308), Z140 (MG138309), Z142 (MG138310), Z260 (MG138314), Z263 (MG138315)
			久治 Jiuzhi	33°31'N, 101°30'E	3	Z135 (MG138311), Z136 (MG138312), Z137 (MG138313)
似方双蚤指名亚种 <i>Amphipsylla quadratoideus quadratoideus</i>		柴达木根田鼠 <i>Microtus limnophilus</i> , 朝鲜姬鼠 <i>Apodemus peninsulae</i>	格尔木 Golmud	36°24'N, 95°03'E	3	Z138 (MG138273), Z147 (MG138275), Z148 (MG138276)
			祁连 Qilian	38°07'N, 100°15'E	1	Z144 (MG138274)
			兴海 Xinghai	35°16'N, 99°58'E	1	Z155 (MG138277)
			久治 Jiuzhi	33°31'N, 101°30'E	1	Z156 (MG138278)
			互助 Huzhu	36°50'N, 102°26'E	1	Z24_09 (MG138280)
			平安 Pingan	36°20'N, 101°54'E	1	Z20_09 (MG138279)
			互助 Huzhu	36°50'N, 102°26'E	2	Z44 (MG138161), Z45 (MG138162)
			共和 Gonghe	36°13'N, 100°31'E	2	Z46 (MG138163), Z47 (MG138164)
			同仁 Tongren	35°31'N, 102°01'E	1	Z48 (MG138165)
			互助 Huzhu	36°50'N, 102°26'E	1	Z36_09 (MG138156)
角叶蚤科 Ceratophyllidae	吡倍蚤指名亚种 <i>Amphipsylla clarus clarus</i>	甘肃鼠兔 <i>Ochotona cansus</i> , 高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i>	互助 Huzhu	36°50'N, 102°26'E	1	Z36_09 (MG138156)
	獭副角蚤扇形亚种 <i>Paraceras melis flabellum</i>	喜马拉雅旱獭 <i>Marmota himalayana</i>	兴海 Xinghai	35°16'N, 99°58'E	1	Z64 (MG138332)

续表 1 Table 1 continued

科 Family	蚤种 Species	宿主 Host	采集地点 Sampling locality	经纬度 Longitude and latitude	蚤数量 Number of fleas	样本编号及其 GenBank 登录号 Nos. of samples and their GenBank accession nos.
	谢氏山蚤 <i>Oropsylla silantiewi</i>	喜马拉雅旱獭 <i>Marmota himalayana</i>	兴海 Xinghai	35°16'N, 99°58'E	8	Z30 (MG138166), Z31 (MG138167), Z32 (MG138168), Z33 (MG138169), Z183 (MG138170), Z184 (MG138171), Z185 (MG138172), Z186 (MG138173)
	细钩盖蚤 <i>Callopsylla sparsilis</i>	青海田鼠 <i>Microtus fuscus</i>	久治 Juizhi	33°31'N, 101°30'E	7	Z40 (MG138174), Z41 (MG138175), Z42 (MG138176), Z43 (MG138177), Z198 (MG138178), Z199 (MG138179), Z200 (MG138180)
	斧形盖蚤 <i>Callopsylla dolabrif</i>	喜马拉雅旱獭 <i>Marmota himalayana</i>	兴海 Xinghai	35°16'N, 99°58'E	10	Z34 (MG138181), Z35 (MG138182), Z36 (MG138183), Z37 (MG138184), Z187 (MG138185), Z188 (MG138186), Z189 (MG138187), Z190 (MG138188), Z191 (MG138189), Z192 (MG138190)
	端圆盖蚤 <i>Callopsylla kozlovi</i>	柴达木根田鼠 <i>Microtus linnophilus</i> , 长尾仓鼠 <i>Cricetulus longicaudatus</i>	兴海 Xinghai	35°16'N, 99°58'E	2	Z193 (MG138191), Z194 (MG138192)
	裂病蚤 <i>Nosopsyllus fidus</i>	子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	格尔木 Golmud	36°24'N, 95°03'E	1	Z201 (MG138193)
	秃病蚤 <i>Nosopsyllus taeniceps</i>	小毛足鼠 <i>Phodopus roborovskii</i> , 子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i> , 柴达木根田鼠 <i>Microtus linnophilus</i>	格尔木 Golmud 共和 Gonghe 民和 Minghe	36°24'N, 95°03'E 36°13'N, 100°31'E 36°19'N, 102°52'E	2 4 1	Z57 (MG138199), Z58 (MG138200) Z55 (MG138197), Z56 (MG138198), Z59 (MG138201), Z60 (MG138202) Z27_09 (MG138196)
	端突病蚤 <i>Nosopsyllus apicoprominus</i>	子午沙鼠 <i>Meriones meridianus</i>	格尔木 Golmud	36°24'N, 95°03'E	2	Z51 (MG138194), Z52 (MG138195)
	刷状瘰蚤指名亚种 <i>Amaraeus penicilliger penicilliger</i>	白尾松田鼠 <i>Pitymys leucurus</i>	格尔木 Golmud	36°24'N, 95°03'E	3	Z62 (MG138203), Z203 (MG138204), Z204 (MG138205)
	钩状单蚤 <i>Monopsyllus hamutus</i>	花鼠 <i>Tamias sibiricus</i>	循化 Xunhua	35°48'N, 102°41'E	3	B55-25 (MG138157), B56-25 (MG138158), B58-25 (MG138160)
	不等单蚤 <i>Monopsyllus anisus</i>	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	同仁 Tongren	35°31'N, 102°01'E	3	Z65 (MG138206), Z66 (MG138207), Z205 (MG138208)
	叉状单蚤 <i>Monopsyllus forcicus</i>	小飞鼠 <i>Pteromys volans</i> , 柴达木根田鼠 <i>Microtus linnophilus</i> , 花鼠 <i>Tamias sibiricus</i>	互助 Huzhu 循化 Xunhua	36°50'N, 102°26'E 35°48'N, 102°41'E	3 1	Z23_09 (MG138209), Z38_09 (MG138210), Z46_09 (MG138211) Z10_09 (MG138155)

定的序列在 NCBI 上运行 BLAST 程序进行序列同源性比较,以确保所获得的序列是目标序列。再运用 MEGA6(Tamura *et al.*, 2013) 软件分析各基因序列的碱基组成和变异,基于 Kimura-2-parameter (Kimura, 1980)模型计算遗传距离、序列碱基组成、保守位点、变异位点、简约信息位点、自裔位点、转换数与颠换数的比值(Ts/Tv)等。

常见的建树方法中,ML 法计算量非常大,极为耗时,MP 法若序列变异大会出现长枝吸引而导致建树错误,BI 法适用于大或复杂的数据集,其缺点是对进化模型比较敏感,邻接法(neighbor-joining, NJ)是基于最小进化原理经常被使用的一种算法,它构建的树相对准确,假设少,计算速度快,适用于进化距离不大,信息位点少的短序列。本研究选用邻接法构建系统发育树,利用埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和白纹伊蚊 *A. albopictus* 的 COI 基因作为外群。分支的置信度采用自展法(Bootstrap analysis, BP)重复检测 1 000 次。

2 结果

2.1 蚤类 COI 基因片段序列分析

本研究共测得 3 总科 6 科 22 属 44 种 182 条 COI 序列(GenBank 登录号:MG138154 – MG138335),另外从 GenBank 中查询的蚤类同源序列经 Clustal X 软件比对,共有 597 个位点。采用 MEGA6 软件进行序列组成分析,结果显示 COI 基因序列中保守位

点有 276 个,变异位点有 321 个,简约信息位点有 280 个,自裔位点有 41 个。同时 A, T, C 和 G 碱基的平均含量分别为 27.6%, 39.7%, 17.5% 和 15.2%,其中 A + T 含量(67.3%)远高于 G + C 含量(32.7%),与目前已测线粒体 DNA 序列中较高的 A + T 含量现象相一致。

由表 2 可以看出,COI 基因序列的碱基转换值明显高于颠换。T-C 间的转换平均值是 15, A-G 间的转换平均值是 5, T-C 转换大于 A-G 间的转换。转换/颠换的平均值 0.92,其中转换数 42,颠换数 45,转换主要发生于 A-G 之间,颠换主要发生于 T-A 之间。第 1 位点 R 值最小,仅 0.69,说明第一位点的替换多是同义替换,不会导致氨基酸的改变。

2.2 系统发育树构建

基于 Kimura-2-parameter 模型,利用 MEGA6 软件邻接法构建青海常见寄生蚤 COI 基因序列的系统发育树,所有序列在系统发育树中形成 44 个高支持度的分支(图 1)。

2.3 遗传距离差异分析

由 MEGA6 软件计算青海省部分蚤种遗传距离,分析其 COI 序列差异可知:全部蚤种内遗传距离 0.01% ~ 2.90%,种间遗传距离 4% ~ 12%,种间遗传距离显著大于种内遗传距离。表 3 以基因条数占比最大的双蚤属为例说明种间距离大小(3.1% ~ 12.5%);表 4 以双蚤属中基因条数最多的长鬃双蚤为例说明种内遗传距离大小(0.001 ~ 0.017)。

表 2 青海省蚤类 COI 基因碱基替换数
Table 2 The base substitutions on COI gene of fleas in Qinghai Province

位点 Site	转换/颠换 (Ts/Tv)	碱基替换数 Number of base substitution															
		TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG
第 1 位点 1st site	0.69	68	10	16	1	10	4	3	0	16	2	57	4	1	0	4	1
第 2 位点 2nd site	3.13	47	5	1	0	5	29	0	0	1	0	58	1	0	0	1	48
第 3 位点 3rd site	1.02	88	0	0	0	0	53	0	0	0	0	23	0	0	0	0	34
平均值 Average	0.92	203	15	18	2	15	86	3	0	17	3	138	5	2	0	6	83

3 讨论

3.1 形态鉴别结果的修订

本研究挑选了形态特征比较明显的蚤标本做分子实验,但这样依然出现了一些鉴定错误,尤其是雌蚤的鉴定结果。通过 NCBI 查询,蚤目现有 7 227 条核酸序列上传,但 COI 基因序列仅 10 条,GenBank

登录号分别为 JN008915 – JN008924 (Gunn *et al.*, 2011)。在分析和比对本研究的蚤类 COI 基因片段序列时,我们发现一些个体的形态鉴别可能存在误定问题。如样本编号为 Z112 的窄板额蚤(雄蚤)的 COI 基因序列与欧洲兔蚤 *Spilopsyllus cuniculi* 的 COI 基因序列(GenBank 登录号: JN008923)核苷酸一致性为 85%,可以认定为蚤类的 COI 基因序列。与该号标本聚为一支的 4 个雌蚤(Z100, Z103, Z108 和

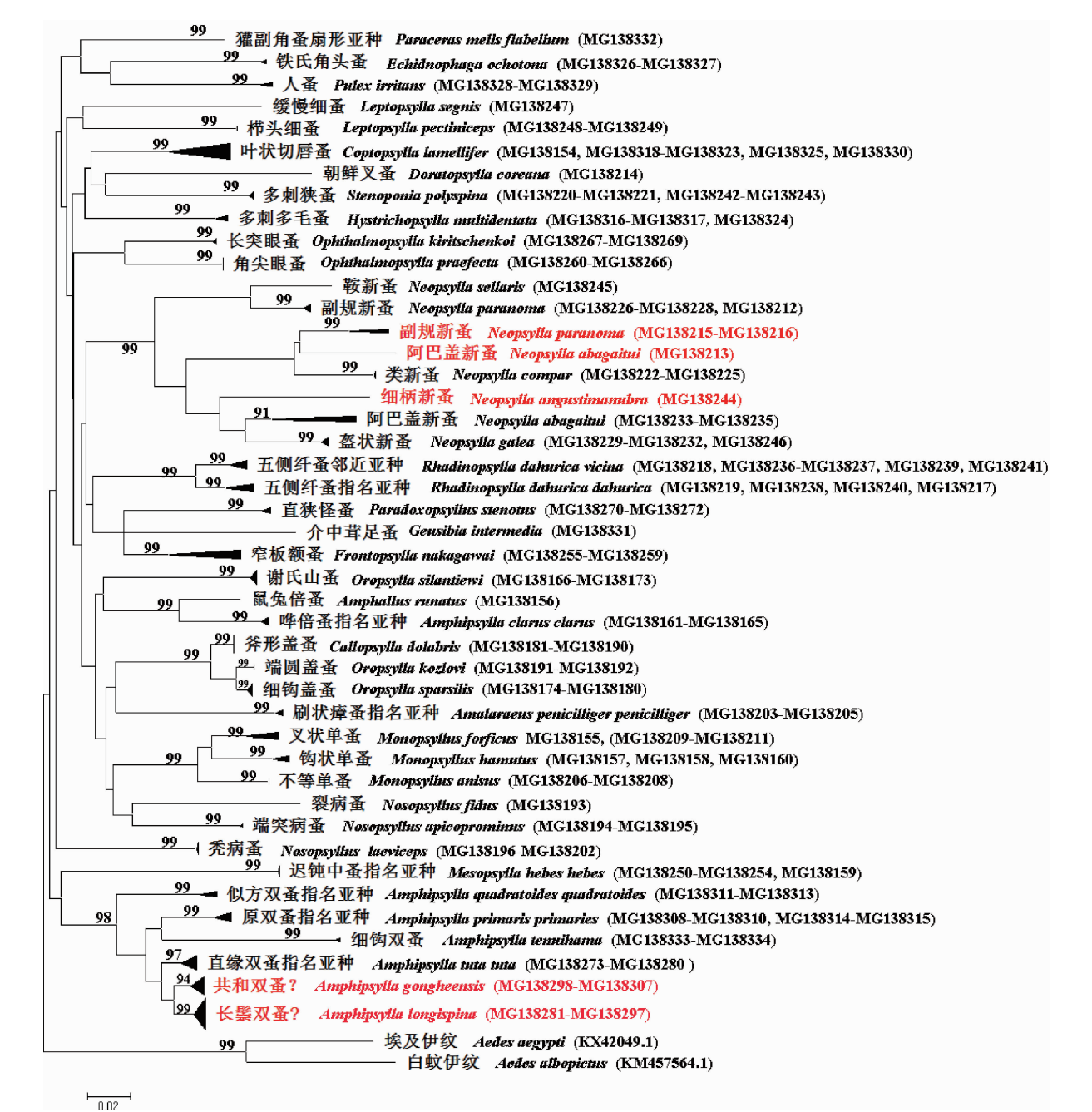


图 1 基于 COI 基因核苷酸序列用 Kimura-2-parameter 模型构建的蚤类邻接系统发育树

Fig. 1 A neighbor-joining phylogenetic tree of fleas based on nucleotide sequence of COI with Kimura 2-parameter model

图中分支上数值为 1 000 次自展检验置信度;标尺示遗传距离;括号内为 GenBank 登录号;问号示暂定种名。The number on the branch indicates bootstrap values for 1 000 replicates. Scale bar represents the genetic distance. The numbers in parentheses are GenBank accession numbers. The question mark indicates the tentative species name.

Z26_09), 根据第 7 腹板形态分别暂定为圆指额蚤、棕形额蚤、毛额蚤和巨凹额蚤。根据蚤类形态鉴别以雄性为主、雌性为辅的原则,我们将这 4 个雌蚤定命为窄板额蚤。鉴于形态常规分类存在鉴定错判的可能,今后蚤类鉴定应以雄性标本外部形态鉴定为主,结合分子鉴定结果进行雌性标本的鉴定,以更好地发现和纠正传统形态学鉴定中的错误,从而科学

地鉴别物种。

3.2 系统发育树的构建和形态分类存在的问题

构建的系统树显示所有个体形成 44 个高支持度的单一分支,提示蚤种类应该有 44 种,这与蚤凭证标本复核结果大致一致,说明 DNA 条形码技术可用于蚤类鉴定。

现场采集的蚤类经镜检鉴定为 66 种,但仅有 2/3

表 3 双蚤属部分蚤种间(6 种)与种内(6 种)的遗传距离(%)

	种间 Inter-species						种内 Intra-species
	长鬃双蚤	共和双蚤	似方双蚤指名亚种	直缘双蚤	原双蚤指名亚种		
	<i>A. longispina</i>	<i>A. gongheensis</i>	<i>A. quadratoides</i>	指名亚种	<i>A. primaris</i>		
			<i>quadratoides</i>	<i>A. tuta tuta</i>	<i>primaries</i>		
长鬃双蚤 <i>Amphipsylla longispina</i>							0.1
共和双蚤 <i>Amphipsylla gongheensis</i>	3.1						0.6
似方双蚤指名亚种 <i>Amphipsylla quadratoides quadratoides</i>	9.2	9.1					1.6
直缘双蚤指名亚种 <i>Amphipsylla tuta tuta</i>	4.3	3.2	9.5				0.2
原双蚤指名亚种 <i>Amphipsylla primaris primaries</i>	7.4	6.5	9.0	6.1			1.6
细钩双蚤 <i>Amphipsylla tenuihama</i>	12.1	11.7	12.5	11.4	11.6		0.5

表 4 长鬃双蚤样本间的种内遗传距离

Table 4 Intra-species genetic distance of <i>Amphipsylla longispina</i> samples																		
样品编号 Sample no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1																		
2	0.000																	
3	0.000	0.000																
4	0.010	0.010	0.010															
5	0.005	0.005	0.005	0.015														
6	0.008	0.008	0.008	0.002	0.014													
7	0.008	0.008	0.008	0.002	0.014	0.000												
8	0.008	0.008	0.008	0.002	0.014	0.000	0.000											
9	0.003	0.003	0.003	0.010	0.008	0.008	0.008	0.008										
10	0.015	0.015	0.015	0.005	0.020	0.007	0.007	0.007	0.015									
11	0.007	0.007	0.007	0.003	0.012	0.002	0.002	0.002	0.007	0.008								
12	0.002	0.002	0.002	0.008	0.007	0.007	0.007	0.007	0.002	0.014	0.005							
13	0.008	0.008	0.008	0.005	0.014	0.003	0.003	0.003	0.012	0.010	0.005	0.010						
14	0.010	0.010	0.010	0.010	0.015	0.008	0.008	0.008	0.010	0.012	0.007	0.008	0.012					
15	0.010	0.010	0.010	0.003	0.015	0.002	0.002	0.002	0.010	0.008	0.003	0.008	0.005	0.010				
16	0.008	0.008	0.008	0.002	0.014	0.000	0.000	0.000	0.008	0.007	0.002	0.007	0.003	0.008	0.002			
17	0.003	0.003	0.003	0.007	0.008	0.005	0.005	0.005	0.003	0.012	0.003	0.002	0.008	0.007	0.007	0.005		
18	0.012	0.012	0.012	0.002	0.017	0.003	0.003	0.003	0.012	0.007	0.005	0.010	0.007	0.012	0.002	0.003	0.008	

的蚤种获得了 COI 基因片段。形态鉴定结果显示双蚤属 *Amphipsylla*、新蚤属 *Neopsylla* 和额蚤属 *Frontopsylla* 的蚤分别为 10、9 和 8 种,但分子实验时新蚤属扩增出的种类最多(7 种),额蚤属最少,只有 1 种,双蚤为 6 种,说明该研究 COI 基因引物适用于新蚤属,不适于额蚤属,提示本研究采用的引物还不适用于整个蚤目,还有必要设计针对蚤目的非特异性引物,用于蚤类 DNA 条形码的实际运用。

五侧纤蚤 *Rhadinopsylla dahurica* 的 COI 基因序列与注册号 JN00918 的欧洲兔蚤 *Spilopsyllus cuniculi* COI 基因序列相似性为 82%,也可以确定为蚤类的 COI 基因序列。在系统发育树图中所有五侧纤蚤标

本分为 2 个高支持率的小分支(置信度 99%),结合现场鉴别结果,将这 2 小分支分别为五侧纤蚤指名亚种与五侧纤蚤邻近亚种。形态鉴别为角尖眼蚤两个亚种(深窦亚种和指名亚种)的标本,其 COI 基因序列在系统发育树中却聚为一个分支,置信度 100%,考虑亚种在形态鉴别中的很多问题和歧义,本研究认为把这一分支直接定为种的阶元——角尖眼蚤,而不再进行亚种的区分。鉴别结果为秃病蚤 2 个亚种(田鼠亚种与指名亚种)的标本在系统发育树中也聚为置信度 100% 的同一分支,出于同样的考虑,我们把这一分支也命名为秃病蚤。上述结果说明,有些蚤类的亚种分类存在遗传学的基础而有

些可能并没有明确的遗传学差异,这些亚种的分类地位值得进一步探讨。

系统发育树中长鬃双蚤与共和双蚤分支中问题较多,有 4 头蚤(2 雌 2 雄)形态鉴定为青海双蚤、2 雌蚤形态鉴定为共和双蚤、2 雌蚤鉴定为青海双蚤、1 雄蚤鉴定为丛鬃双蚤,但上述 9 头蚤却和长鬃双蚤聚为一支;共和双蚤分支中有 1 雄蚤形态鉴定为长鬃双蚤。复检透明标本后我们认为形态鉴别无误,所以把这两支暂时归为疑似长鬃双蚤、疑似共和双蚤类群。这些结果一方面提示为准确做好蚤类分子鉴定,有必要联合多种基因标记综合研判,以防研究结果出现偏颇;同时,也可能存在一些近缘种的同种异名问题。

系统发育树中新蚤属细柄新蚤、阿巴盖新蚤聚在 4 个不同分支内,这在其他蚤种的系统发育树结果并未出现。因试剂盒提取 DNA 时,每头蚤都是单独提取,排除了样品交叉污染的可能。查找原始资料后发现标记红色的三分支样本均为 1 头,细柄新蚤(1 ♀)采自久治县的青海田鼠;副规新蚤(1 ♂)采自互助县的黄胸鼠体表,其上的副规新蚤黑色分支(2 ♂ 2 ♀)采自兴海县和互助县的甘肃鼯鼠体;阿巴盖新蚤(1 ♂)采自平安县的长尾仓鼠,其下的阿巴盖新蚤黑色分支(1 ♂ 2 ♀)采自都兰县和尖扎县的高原鼠兔;上述蚤种我们复鉴凭证标本的形态特征后认为形态鉴定无误,提示宿主和采集地的不同,会导致蚤种的分子数据不同,这在分类形态特征差别甚小的蚤属中尤为突出,从分子层面印证了隐种存在的可能性。

尽管 NJ 法建树有很多优点,但它也有其局限性,如所分析序列的遗传距离不能太大,对基因序列上的所有位点都等同对待,所构建的系统树难以说明种上水平的进化关系。今后如果在分子鉴定的基础上开展分子系统学的研究,则需要用两种或以上的方法建树,让构建的分子树更具有说服力。

在对物种进行 DNA 条形码分类的过程中,我们必须依据传统分类方法,假设目的物种为纯种并且归类正确,在此基础上再测定 COI 基因序列,以此作为该物种的 DNA 条形编码,供其他学者参考对比。尽管 DNA 条形码鉴定前景非常乐观,但在现阶段的使用中不能完全抛弃形态学手段,并应与经典分类紧密结合并尽可能保存凭证标本,而且还必须突破单分子标记的局限性。

蚤类系统发育研究还处于早期阶段,不同学者应用的分子标记不同影响了研究结果的可比性,今

后应寻求适于蚤目分子系统学研究的标准标记以利于不同学者的协作研究。分子生物学方法在昆虫系统学研究中发挥了极为重要的作用,但并不能解决形态分类中的所有难题,形态数据与分子数据联合分析是昆虫分子系统学研究发展的趋势,两者作为系统学研究的互补信息可以更好地解决蚤类群系统进化问题。

参考文献 (References)

- Cai LY, Zhan XR, Wu WZ, 1987. The flea fauna of Qinghai Province. *Acta Biol. Plat. Sin.*, 7(1): 87–107. [蔡理芸, 詹心如, 吴文贞, 1987. 青海的蚤类区系. 高原生物学集刊, 7(1): 87–107]
- Cai LY, Zhan XR, Wu WZ, Li C, 1997. The Flea Fauna of Qinghai-Xizang Plateau. Shaanxi Science and Technology Publishing House, Xi'an. 10–296. [蔡理芸, 詹心如, 吴文贞, 李超, 1997. 青海高原蚤目志. 西安: 陕西科学技术出版社. 10–296]
- Dunnet GM, Mardon DK, 1991. Siphonaptera. In: Naumann PBC, Lawrence JF, Nielsen ES, Spradberry JP, Taylor RW, Whitten MJ, Littlejohn MJ eds. *Insects of Australia: a Textbook for Students and Research Workers*. 2nd ed. Division of Entomology, CSIRO, Australia. Melbourne University Press, Melbourne. 125–140.
- Folmer O, Black M, Hoch W, Lutz R, Vrijenhoek, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(5): 294–299.
- Gunn K, Sarawan K, Linda MM, Halina B, Mark DB, Peter JA, Una R, Peter JI, Stanley GF, 2011. Genetic characterization of flea-derived *Bartonella* species from native animals in Australia suggests host-parasite co-evolution. *Infect. Gen. Evol.*, 11(1): 1868–1872.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(4): 968–971.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16(2): 111–120.
- Liu SS, Zhang GF, Wu Q, Zhang AB, Wang JJ, Wan FH, 2012. Establishment and application of DNA barcoding technology for identification of the immatures and adult debris of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(3): 336–343. [刘慎思, 张桂芬, 武强, 张爱兵, 王进军, 万方浩, 2012. 桔小实蝇幼体及成虫残体 DNA 条形码识别技术的建立与应用. 昆虫学报, 55(3): 336–343]
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6. 0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25(24): 4876–4882.